

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-329002

(P2001-329002A)

(43) 公開日 平成13年11月27日 (2001. 11. 27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08	Z 4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/728		A 6 1 K 31/728	4 C 0 8 1
47/36		47/36	4 C 0 8 6
A 6 1 L 15/16		A 6 1 P 41/00	4 C 0 9 0
A 6 1 P 41/00		A 6 1 L 15/01	
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 9 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-154943 (P2000-154943)

(22) 出願日 平成12年 5 月25日 (2000. 5. 25)

(71) 出願人 000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号

(72) 発明者 姫田 康一

東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社中央研究所内

(72) 発明者 梅田 俊彦

東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾ヒアルロン酸ゲルとその製造方法及びそれを含有する医用材料

(57) 【要約】

【課題】 架橋剤等を使用することなく、安全性、生体適合性に優れ、及び溶解性が制御された修飾ヒアルロン酸ゲル及びそれを含有する医用材料を提供すること。

【解決手段】 中性水溶液に難溶性であることを特徴とする修飾ヒアルロン酸単独で形成された修飾ヒアルロン酸ゲルを構成とする。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 中性水溶液に難溶性であることを特徴とする修飾ヒアルロン酸単独で形成された修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項2】 ヒアルロン酸の水酸基に置換基が導入されたことを特徴とする請求項1記載の修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項3】 置換基が桂皮酸である修飾ヒアルロン酸を用いたことを特徴とする請求項2記載の修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項4】 桂皮酸のヒアルロン酸への導入率が0.05質量%以上であることを特徴とする請求項3記載の修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項5】 中性の25℃の水溶液中で1日での溶解率が25%以下であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項6】 修飾ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化された修飾ヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲル。

【請求項7】 修飾ヒアルロン酸の水溶液を、pH3.5以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項8】 修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及びヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分とを共存させ、該共存状態を保持することにより修飾ヒアルロン酸ゲルを形成することを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項9】 修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及び修飾ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分との共存下で、該共存状態を-10℃～30℃で保持して修飾ヒアルロン酸ゲルを形成することを特徴とする請求項8記載の修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項10】 修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及び修飾ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分との共存下で、該共存状態を-10℃～30℃で保持して修飾ヒアルロン酸ゲルを形成し、該ゲルを中和に用いる溶液で処理することを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項11】 修飾ヒアルロン酸が桂皮酸修飾ヒアルロン酸であることを特徴とする請求項7～10のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項12】 次の(a)、(b)の要件を満たす修飾ヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする医用材料。

(a) 中性の25℃の水溶液中で1日での溶解率が25%以下である、(b) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条

件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化された修飾ヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化された修飾ヒアルロン酸中に分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む。

【請求項13】 修飾ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した1種であることを特徴とする請求項12記載の医用材料。

【請求項14】 医用材料が癒着防止材、創傷被覆材、又は薬物送達システム(DDS)を目的とした薬物担体からなる群より選択した1種であることを特徴とする請求項13記載の医用材料。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規な修飾ヒアルロン酸ゲル及びその製造方法に関し、更に特にそれらの生体適合性の良好な医用材料に関する。

**【0002】**

【従来の技術】 ヒアルロン酸は、 $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布するほか、ニワトリのとさか、連鎖球菌の夾膜などにも存在が知られている。ニワトリのとさか、臍帯等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調整されている。天然産のヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。

【0003】 我々は、ヒアルロン酸の水溶液を特定のpHに調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことによって、ヒアルロン酸ゲルが得られ、こうして得られたヒアルロン酸ゲルの水中での溶解速度が極めて遅いことを見出している(特開平10-117564号)。また、このゲルを用いることで癒着防止材をはじめとする各種の医用材料が提供できることも確認した。

【0004】 これまでに、ヒアルロン酸を化学的に修飾して任意の置換基を導入する方法が各種考案されている。この一例としては、ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩がジメチルスルフォキシド等の有機溶媒に溶解する特徴を利用したヒアルロン酸の化学的修飾方法が開示されている(特開平3-105003号)。また、ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩をジメチルスルフォキシド中で、トリエチルアミンとヨウ化2-クロロ-1-メチルピリジニウムを加え反応させ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と水酸基間でエステル結合を形成させる方法も開示されている(欧州特許0341745A1)。更には、エステル結合により乳酸やビルビン酸などの有機酸を導入する方法も考案されている

(特開平6-016702号、特開平6-298804号)。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】我々は、上記のヒアルロン酸ゲルを検討する過程で、ヒアルロン酸になんらかの修飾基を導入しても、その酸性凍結によるゲル化が妨げられないことを見出した。また、このような修飾ヒアルロン酸ゲル組成物は、そのゲルの難溶性を利用し、薬物送達システムの担体として利用可能であることも確認している。以前の我々の検討ではゲル化の際に任意の薬物を系に混在させることで薬物を取りこんだゲルを提案しているが(特開平11-043287号)、直接薬剤をヒアルロン酸に結合させた修飾ヒアルロン酸ゲルを用いれば、ゲルの溶解と薬物の放出を一致させることができる。また、今回製造した桂皮酸をヒアルロン酸に結合させたヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸単独のゲルよりも溶解性が低く、安定なものが得られており、特定の修飾基の導入でヒアルロン酸ゲルの特徴である難溶性を変化させることが可能である。そして、特定の修飾基の導入によるヒアルロン酸ゲルは溶解性の制御が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1)中性水溶液に難溶性であることを特徴とする修飾ヒアルロン酸単独で形成された修飾ヒアルロン酸ゲル、(2)ヒアルロン酸の水酸基に置換基が導入されたことを特徴とする(1)記載の修飾ヒアルロン酸ゲル、(3)置換基が桂皮酸である修飾ヒアルロン酸を用いたことを特徴とする(2)記載の修飾ヒアルロン酸ゲル、(4)桂皮酸のヒアルロン酸への導入率が0.05質量%以上であることを(3)記載の特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲル、(5)中性の25℃の水溶液中で1日での溶解率が25%以下であることを特徴とする(1)～(4)のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲル、(6)修飾ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化された修飾ヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする(1)～(5)のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲル、(7)修飾ヒアルロン酸の水溶液を、pH3.5以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法、(8)修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及びヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分とを共存させ、該共存状態を保持することにより修飾ヒアルロン酸ゲルを形成することを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法、(9)修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及び修飾ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分との共存下で、該共存状態を-10℃～30

℃で保持して修飾ヒアルロン酸ゲルを形成することを特徴とする(8)記載の修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法、(10)修飾ヒアルロン酸と、修飾ヒアルロン酸濃度5質量%以上にする水、及び修飾ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分との共存下で、該共存状態を-10℃～30℃で保持して修飾ヒアルロン酸ゲルを形成し、該ゲルを中和に用いる溶液で処理することを特徴とする修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法、(11)修飾ヒアルロン酸が桂皮酸修飾ヒアルロン酸であることを特徴とする(7)～(10)のいずれか1項に記載の修飾ヒアルロン酸ゲルの製造方法、(12)次の

(a)、(b)の要件を満たす修飾ヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする医用材料、

(a)中性の25℃の水溶液中で1日での溶解率が25%以下である、(b)ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化された修飾ヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化された修飾ヒアルロン酸中に分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む、(13)修飾ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した1種であることを特徴とする(12)記載の医用材料、(14)医用材料が癒着防止材、創傷被覆材、又は薬物送達システム(DDS)を目的とした薬物担体からなる群より選択した1種であることを特徴とする(13)記載の医用材料である。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100(微工研菌寄第9027号)、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300(微工研菌寄第2319号)のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

【0008】本発明の修飾ヒアルロン酸とは、ヒアルロン酸の任意の部位に置換基を導入したものをいう。ヒアルロン酸は $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸から構成されるが、このどちらへ置換基を導入してもよく、また部位も限定されるものではない。修飾ヒアルロン酸の合成方法も特に限定されるものではなく、修飾ヒアルロン酸のゲル化が妨げられ得ない限りエステル化、アシル化をはじめとする種々の合成法が適応できる。置換基の導入率もヒアルロン酸1分子あたり1ユニット以上の修飾が行われていればよく、また

修飾ヒアルロン酸のゲル化が妨げられないまでに導入率を上げることできる。

【0009】ゲルとは、新版高分子辞典（朝倉書店 昭和63年）によれば、「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体」と定義されている。理化学辞典（岩波書店 第4版 昭和62年）によれば、「ゾル（コロイド溶液）がゼリー状に固化したもの」と定義されている。

【0010】本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルとは、中性水溶液中に難溶性であることを特徴とし、この修飾ヒアルロン酸ゲルを中性水溶液中に投入すると、ゲル化していない修飾ヒアルロン酸と比較して有意の難溶性を示す。難溶性は、中性の25℃の水溶液中でのゲルの形態の保持とゲルの溶解率で規定する。ここで、中性水溶液とは、pH7に調整された緩衝能を有する生理的食塩水である。本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルは、アルカリ性水溶液中、例えばpH11のアルカリ性緩衝水溶液中に投入すると速やかに溶解する特徴も有する。

【0011】本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルとは、三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体である。三次元網目構造は修飾ヒアルロン酸の架橋構造によって形成されている。

【0012】本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化された修飾ヒアルロン酸が架橋構造を保持している場合、分岐点を有する修飾ヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状の修飾ヒアルロン酸と区別することができる。

【0013】本発明でいうヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件としては、水溶液のpH1.5、温度60℃が適当である。ヒアルロン酸のグリコシド結合の加水分解による主鎖切断反応が、中性の水溶液中と比較して、酸性やアルカリ性の水溶液中で著しく促進される。更に酸加水分解反応は、反応温度が高い方が促進される。

【0014】本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルの促進酸加水分解の反応時間は、修飾ヒアルロン酸ゲルの構造、例えば原料ヒアルロン酸の分子量と分子量分布、架橋度によって大きく左右される。可溶化された修飾ヒアルロン酸の割合が大きく、分岐度が大きくなる反応条件を選択できる。反応条件が弱い場合は、可溶化された修飾ヒアルロン酸の割合が小さく、逆に反応条件が強い場合は、可溶化された修飾ヒアルロン酸の分子量が著しく小さくなるので、分岐度測定が困難になる。また、分岐点自体が分解する可能性も増大する。反応条件は、目視で確認できる修飾ヒアルロン酸ゲルがほとんど消失する反応時間、または可溶化された修飾ヒアルロン酸の割合が50%以上になる反応時間が好ましい。

【0015】本発明に用いられるヒアルロン酸および修飾ヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5$ ～約 $1 \times 10$

7ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得た低分子量のものでも同様に好ましく使用できる。なお、本発明にいうヒアルロン酸および修飾ヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

【0016】本発明に用いられる修飾ヒアルロン酸の水溶液は、修飾ヒアルロン酸の粉末と水を混合し、攪拌して得られる。この修飾ヒアルロン酸の濃度は5.0質量%以下が水溶液の処理上好都合である。分子量が $2 \times 10^6$ ダルトン以上の修飾ヒアルロン酸を使用する場合は、濃度は2.5質量%以下が好ましい。

【0017】修飾ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

【0018】修飾ヒアルロン酸の水溶液のpHは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するpHに調整する。酸型のヒアルロン酸の解離の平衡定数は、ヒアルロン酸濃度の無限希釈のとき $\log K_0 = 4.25$ である（Acta Chimica Hungarica - Models in Chemistry 129(5) 671-683 1992）。調整されるpHはヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、凍結及び解凍の条件、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、本発明では、pH3.5以下に調整することが必要である。好ましくは、pH2.5以下である。

【0019】凍結、解凍は修飾ヒアルロン酸の調製された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量により修飾ヒアルロン酸の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは-5℃以下の凍結温度、5℃以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

【0020】修飾ヒアルロン酸の調製された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用する修飾ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

【0021】修飾ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の

凍結解凍により得られた修飾ヒアルロン酸ゲルは、修飾ヒアルロン酸の酸加水分解を避けるために、酸性に調整するために用いた酸等の成分を中和する必要がある。中和は、通常は生理的あるいは薬学的に許容な溶液によって行う。修飾ヒアルロン酸ゲルの機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液等が好適に用いられる。

【0022】また、中和の方法は、特に制限はないが、通常は、バッチ法、濾過法、カラム等に充填して通液する方法等が用いられる。これらの中和条件は、中和液量、回数等を含めて、中和したい成分を目標の濃度以下にできる条件であればよく、修飾ヒアルロン酸ゲルの形態や用途により適宜選択することが可能である。

【0023】この中和に用いる溶液で処理された修飾ヒアルロン酸ゲルは、その使用目的に応じて、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿潤状態、風乾、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で医用材料として供される。

【0024】次に、凍結を行わずに5質量%以上になるように固体修飾ヒアルロン酸と酸溶液を混合し、放置することによる該修飾ヒアルロン酸ゲルの製造法について述べる。用いる修飾ヒアルロン酸の由来や分子量、用いる酸の種類などは凍結・解凍によってゲル化させる場合（凍結法）におけるそれと全く同様である。更にゲルを形成させた後の中和、洗浄法やその後の処理についても凍結法で製造する場合と異なるものではない。

【0025】修飾ヒアルロン酸と酸溶液の混合は、修飾ヒアルロン酸の酸加水分解をさけるためになるべく低温下で処理することが望ましい。しかし、高温下であっても極短時間で混和が終了する場合には、そのような条件下であっても修飾ヒアルロン酸ゲルを得ることは可能である。また、酸溶液が凍結するような氷点以下の条件における混合であっても修飾ヒアルロン酸と酸溶液の均一混合体を得ることができれば、修飾ヒアルロン酸ゲルを得ることができる。また、混合が不均一であった場合には混合されていない部分では当然ゲル化しないという現象が起こりうるが、その後の洗浄操作（中和）により未反応分を除去して修飾ヒアルロン酸ゲルを調製することも可能である。修飾ヒアルロン酸と酸溶液の混合体を一定温度で放置し、ゲル化を進行させ修飾ヒアルロン酸ゲルを得ることができるが、放置温度と放置時間は一義的に定義されるものではない。放置温度が低ければ酸加水分解を抑制でき、修飾ヒアルロン酸分子の主鎖の分解を抑制できるが、ゲル化速度が低下する傾向がより強くなるために、求める物性を考慮して決定されるものである。

【0026】本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルは、修飾ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下で修飾ヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化された修飾ヒアルロン酸が架橋構造を保

持している場合、分岐点を有する修飾ヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状の修飾ヒアルロン酸と区別することができる。

【0027】本発明でいう修飾ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件としては、水溶液のpH1.5、温度60℃が適当である。ヒアルロン酸のグリコシド結合の加水分解による主鎖切断反応が、中性の水溶液中と比較して、酸性やアルカリ性の水溶液中で著しく促進される。更に酸加水分解反応は、反応温度が高い方が促進される。

【0028】本発明ではGPC-MALLS法を用い、GPCで分離された分子量フラクションの分子量と分岐度をオンラインで連続的に測定した。本発明では、同一溶出体積のフラクションの可溶化された修飾ヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状修飾ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法を使って分岐度の測定を行った。分岐度は可溶化された修飾ヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たり存在する分岐点の数であり、可溶化された修飾ヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。このGPC-MALLS法を用いた溶出体積法による分岐度測定についてはPCT/JP98/03536号に詳しく述べられている。

【0029】可溶化された修飾ヒアルロン酸は、GPC溶媒で希釈して濃度を調製し、0.2 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した後測定に供した。本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲル中に、修飾ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造がある場合、可溶化された修飾ヒアルロン酸に分岐構造が高分子溶液論的に確認される。本発明でいう修飾ヒアルロン酸ゲルの分岐度は0.5以上である。

【0030】次に以上のようにして製造された修飾ヒアルロン酸ゲルの医療用途に利用する際の加工方法について述べる。修飾ヒアルロン酸ゲルの成形加工等の処理は、作製時には、容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状の所望の形態の修飾ヒアルロン酸ゲルの作製が可能である。例えば、板上にキャストリングして凍結することによりフィルム状及びシート状の形態が得られるし、水と混和しない有機溶剤と激しく混合攪拌しながら凍結解凍することにより破碎状の形態が得られる。

【0031】修飾ヒアルロン酸ゲルの作製後の加工としては、機械的粉碎による微細な破碎状や、圧延によるフィルム化、紡糸等が例示される。一方、特に成形加工のための処理を行わなくても、適切な作製条件を選ぶことにより目的の形状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られる場合もある。例えば、修飾ヒアルロン酸濃度が0.1%以下、好ましくは0.05%以下の調整された酸性溶液の凍結解凍により、微細繊維片状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られる。

【0032】本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲル

は、一般の生体内分解性医用材料及びヒアルロン酸が用いられる分野であれば特に制限なく使用することができる。例えば、癒着防止剤、薬理活性物質の担体、創傷被覆剤、人工皮膚、組織置換型生体組織修復剤、関節注入剤、外科手術用縫合糸、止血剤、人工臓器、人工細胞外マトリックス又は人工基底膜、診断・治療に用いる医療器具・医療用具等の生物医学的製品又は医薬組成物への使用が挙げられる。

【0033】修飾ヒアルロン酸ゲルの各種成形加工品は、単一形態での使用は当然ながら、異なるヒアルロン酸ゲル形態との混合又は併用、更にゲル化されていないヒアルロン酸との混合又は併用による組合せ処方により効果の増強が期待できる。例えば、腹腔内術後癒着防止剤としてシート状修飾ヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の併用による効果は、局所効果と腹腔内全体効果が期待できる。また、関節注入剤として破砕状修飾ヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の混合による効果は、即時効果と遅延効果が期待できる。

【0034】以下に、本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルの医用材料としての有用性を、薬理活性物質の徐放用担体としての使用を例に挙げて説明する。本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルは、その構造中に薬理活性物質を結合させてその薬理活性物質を徐放化させる担体として用いることが可能である。この場合、薬理活性物質の種類、使用形態、使用部位、必要持続時間に応じて修飾ヒアルロン酸ゲルの分解性に代表される性質や形状をコントロールすることにより、種々の薬理活性物質に、また、種々の使用形態に適用可能となる。適当な製剤化と併せて、目的に応じた薬理活性物質の放出が可能な医薬品製剤が得られる。徐放化製剤の投与方法としては、経口、経皮、経粘膜、注射、及び体内埋込等が挙げられる。

【0035】次に、本発明の癒着防止材について説明する。本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルの癒着防止材は、シート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状等の形態で外科手術に用いられる。用いられる形態としては、フィルム状又はシート状として外科手術部位に直接貼付するのが好ましい。または、微細破砕状として注射器で外科手術部位に塗布するのが好ましい。または、ゲル又はフィルム状として腹腔鏡で手術部位に貼塗するのが好ましい。これらの医用材料に適応する場合には、炎症忌避などの観点から無菌の材料が必要とされる。修飾ヒアルロン酸ゲル医用材料については、バイオクリーンルーム等の無菌系で修飾ヒアルロン酸の合成をし、それをゲル化することで、そうした無菌材料が調製可能である。また、製造後に熱滅菌や放射線滅菌に供する事でも同様な材料が製造可能である。

【0036】さらに、生理活性物質結合した修飾ヒアルロン酸の調整された酸性溶液で凍結解凍を行うことによ

り、生理活性物質を包含した修飾ヒアルロン酸ゲルの癒着防止材を得ることも可能である。修飾ヒアルロン酸ゲルの癒着防止材は、癒着が生じるいかなる動物にも適用でき、哺乳動物、特に人間に於いて好適に手術後の癒着を防止することができる。

【0037】生体内の投与場所は腹腔、胸腔内の各種臓器、腱鞘、頭蓋、神経、及び眼球、等に係わる、腹部手術、婦人科手術、胸部手術、腱や靱帯に係わる整形外科手術、硬膜に係わる神経外科手術など、特に制限されるものではない。

【0038】本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルの癒着防止材の投与時期は、術後の癒着を防止できるどの時期でも良く、手術中又は手術終了時に投与できるが、特に手術終了の直前に投与するのが好ましい。

【0039】次に、本発明の創傷被覆材について説明する。臨床における適用範囲は、外傷による組織断裂・欠損、熱傷創、潰瘍創、褥瘡等の形成外科分野の創傷の他、耳鼻科分野における外傷、中耳炎等による鼓膜穿孔、さらに血管、神経における創傷が想定される。また、適用部位に応じ、その形状をシート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状から選択することが可能である。

【0040】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 【0041】

##### 【実施例】実施例1

分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム80mgを水20mlとジオキサン10mlの混合溶液に溶解した。氷冷上で攪拌しながら桂皮酸クロリド144 $\mu$ l、トリエチルアミン139 $\mu$ lを加え、更に4-ジメチルアミノピリジン122mgを2mlジオキサンに溶解したものを加え、室温で1時間反応させた。反応終了後、エタノール析出により修飾ヒアルロン酸を分離・洗浄し、これを凍結乾燥することで白色の修飾ヒアルロン酸粉末を得た。修飾ヒアルロン酸の合成の確認については、GPC分析によって評価を行った。すなわち、リン酸緩衝液を溶媒として、高分子分画用カラムであるSHODEX社806カラムを用いてサンプルを溶出させ、UV検出器により桂皮酸を、そしてRI検出器によりヒアルロン酸を検出した。桂皮酸はヒアルロン酸に比べて非常に低分子量であるために、ヒアルロン酸と桂皮酸の混合物を分析した場合には、まずヒアルロン酸が溶出し、その後に桂皮酸が溶出してくる。しかし、合成した修飾ヒアルロン酸を分析してみると、両者がまったく同時に溶出していることが確認され、桂皮酸がヒアルロン酸に化学的に結合した桂皮酸修飾ヒアルロン酸が合成されていることが確認できた。この分析によると結合率は0.25質量%だった。また、GPC以外にも熱分解GC/MS（装置：日本電子製DX303とフロンティ

アラボ製PY-2020D、カラム：DB-1HT、熱分解温度590℃)によっても、熱分解生成物の桂皮酸エチルの検出から桂皮酸修飾ヒアルロン酸の結合評価も行い、桂皮酸修飾ヒアルロン酸が合成されていることが確認できた。

#### 【0042】実施例2

分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム80mgを水20mlとジオキサン10mlの混合溶液に溶解した。氷冷上で攪拌しながら桂皮酸クロリド72 $\mu$ l、トリエチルアミン139 $\mu$ lを加え、更に4-ジメチルアミノピリジン122mgを2mlジオキサンに溶解したものを加え、室温で1時間反応させた。反応終了後、エタノール析出により修飾ヒアルロン酸を分離・洗浄し、これを凍結乾燥することで白色の桂皮酸修飾ヒアルロン酸粉末を得た。得られた白色粉末を水に溶解し、これをGPC分析した。UV検出器で置換基を、RI検出器でヒアルロン酸をそれぞれ定量し結合率を評価した。結合率は0.1質量%だった。

#### 【0043】実施例3

実施例2で製造した修飾ヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、1質量%の修飾ヒアルロン酸の水溶液を調整した。この水溶液のpHを、1mmol/l塩酸でpH1.5に調整した。修飾ヒアルロン酸の酸性水溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。65時間放置した後、25℃で解凍した。その結果、スポンジ状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られた。次いでこのゲルを、100mmol/lのリン酸緩衝液(pH6.8)に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和した後に、-20℃で凍結し、凍結乾燥してスポンジ状の修飾ヒアルロン酸を得た。該スポンジ状の修飾ヒアルロン酸を修飾ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

#### 【0044】実施例4

実施例3に於いて、修飾ヒアルロン酸濃度を0.1質量%にして修飾ヒアルロン酸の水溶液を調整した。そして、実施例3と同様の操作を行った。その結果、スポンジ状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0045】実施例5

実施例3に於いて、分子量が $6 \times 10^5$ ダルトンの修飾ヒアルロン酸ナトリウムを溶解して修飾ヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例1と同様に調整し、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。6時間以上の凍結と25℃で2時間以上の解凍を5回繰り返した。その結果、スポンジ状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0046】実施例6

実施例3に於いて、凍結温度を-10℃に設定した。77時間その雰囲気下で放置した後、25℃で解凍した。その結果、スポンジ状の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0047】実施例7

修飾ヒアルロン酸1gを乳鉢に取り、5mlの1mmol/l硝酸溶液を添加し、容器を氷冷しながら5分間乳棒でかき混ぜて、修飾ヒアルロン酸と酸を混合した。これをビニール袋に移し替え、4℃で4日間放置した。その後これを取り出し100mmol/lのリン酸緩衝液(pH6.8)500mlに浸漬させ、液を6時間おきに数回、同じ溶液で置換して完全にゲルを中和して、修飾ヒアルロン酸ゲルを得た。

#### 【0048】比較例1

実施例3に於いて、修飾ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整せずに、凍結し、解凍することを8回繰り返した。その結果、修飾ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。

#### 【0049】比較例2

実施例3で調整した修飾ヒアルロン酸の水溶液を使って、60℃で風乾し、厚さ約100 $\mu$ mのキャストフィルムを得た。該キャストフィルムを修飾ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

#### 【0050】参考例1

実施例3で修飾ヒアルロン酸のかわりに修飾を行っていないヒアルロン酸を用いて、同一の条件下でスポンジ状のヒアルロン酸ゲルシートを製造し、ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

#### 【0051】実施例8

修飾ヒアルロン酸ゲルの分岐度測定

実施例3～7で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルを、pH1.5の塩酸水溶液15mlに浸漬し、60℃、6時間の加水分解を行った。ゲルは加水分解により可溶化され、これをGPC溶媒で2倍に希釈して濃度を0.05質量%に調製し、0.2 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。実施例3～7で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルの分岐度は、いずれも0.5以上であった。

#### 【0052】実施例9

修飾ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験

生理的食塩水に50mmol/l濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例で得られたスポンジ状の修飾ヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で150mgの修飾ヒアルロン酸を含む修飾ヒアルロン酸ゲルに対して、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、修飾ヒアルロン酸ゲルをリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。また、比較例の修飾ヒアルロン酸固形物は、乾燥重量で150mgを50mlのリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。そして、25℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出する修飾ヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中の修飾ヒアルロン酸濃度から求めた。従って、中性の25℃の水溶液中での修飾ヒアルロン酸ゲルの溶解性は、上記試験により規定されるものである。

【0053】修飾ヒアルロン酸濃度の測定  
リン酸緩衝生理的食塩水中の修飾ヒアルロン酸の濃度は、GPCを使って、RI検出器のピーク面積から求めた。

【0054】上記に従い、具体的の実施例3の修飾ヒアルロン酸ゲル及び比較例2の修飾ヒアルロン酸固形物の

溶解性試験を行った。また、参考までに参考例1のヒアルロン酸ゲルの溶解性試験も行った。その結果を表1に示す。

【0055】

【表1】

実験No.	溶解率 [%]			備考
	1日	3日	7日	
1	0	4.8±2.0	14.3±7.7	実施例3
2	100	100	100	比較例2
3	5	18	28	参考例1

【0056】例えば、実験No. 1の実施例3で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、1日経過後では、0%（検出限界以下）の溶解率であり、3日経過後では4.8±2.0%の溶解率であり、更に7日経過後では14.3±7.7%の溶解率であった。即ち、7日経過後でも85.7%の修飾ヒアルロン酸ゲルが残存していた。スポンジ状の形態も保持されていた。それに対して、実験No. 2の比較例2で得られた厚さ約100μmのキャストフィルムの溶解率を調べると、1日経過後では、100%の溶解率であり、完全に溶解した。また、4日経過後、及び7日経過後も100%溶解している状態を維持していた。さらに修飾をしていないヒアルロン酸ゲル（実験No. 3）と比較すると水中での溶解速度が遅く、有意に安定であった。よって、比較例（実験No. 2）で得られた修飾ヒアルロン酸固形物の水中での溶解速度が極めて速いのに対して、本発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲル（実験No. 1）の水中での溶解速度が極めて遅いことが見出される。これより、本願発明で得られた修飾ヒアルロン酸ゲルは、生体内滞留時間が長いことが示唆される。

【0057】実施例10

ラット盲腸擦過モデルにおける癒着防止試験

癒着誘導法

ラット（SD、メス、9週齢以上）下肢に麻酔剤（ケラタン溶液）を筋注し麻酔後、仰向けに固定してインソジンにて腹部皮膚を消毒後、剪毛を行った。ラット腹筋を正中線に沿って開腹し、盲腸を腹腔内から取りだし、盲腸を有孔（φ16mm）テフロン（登録商標）シートで固定した。孔から露出した盲腸部分にガーゼをかぶせた回転棒（φ13mm）を押し当て約120回擦過した（片面2カ所）。擦過部に実施例3で得た修飾ヒアルロン酸ゲル組成物を原料として作製したフィルム状癒着防止材約4cm×4cm片をあて、盲腸を元に戻して木綿糸で縫合を行った。また、癒着防止材を処置せず、そのまま盲腸を戻したものをコントロールとした。こうした処置はコントロールを含めた各実験で10匹ずつのラットを用いた。術後一週間程度で剖検し、癒着防止効果を評価した。その結果を表2に示す。

【0058】

【表2】

実験No.	実験群	癒着の形成割合	備考
4	無処置	9/10	コントロール
5	実施例3で作製したゲルシート処置	5/10	実施例3

【0059】表2より、無処置で癒着の形成割合が10匹中9匹であるのに対して修飾ヒアルロン酸ゲルシートを処置した物はいずれも5匹にまで発生率が低下している。更に癒着スコア平均値も低減されていた。また、これらの修飾ヒアルロン酸ゲルシートを処置した部位には炎症等の発生は見られなかった。

#### 【0060】実施例11

ゲル創傷被覆材のラット皮膚欠損モデルによる創傷治療効果試験

7週令(約200g)のウィスター(Wistar)系、雌性ラットの背部の毛を刈り、エーテル麻酔下で眼科用ハサミを用いて背部皮膚部分を直径2cmの円状に取り除き、完全皮膚欠損創を作製した。医療用不織布ガーゼ(40×40mm:2枚重ね)のみを適応した無処置

群、実施例3で得た修飾ヒアルロン酸ゲルを用いて作成したゲルシート(30×30mm)を創面に被覆後、医療用不織布ガーゼ(40×40mm:2枚重ね)を適応した処置群を設定した。各群6匹のラットを用いた。医療用不織布ガーゼは粘着包帯で設定し、更にテーピングで固定した。治療効果は、創面積の経時変化を測定することで比較した。すなわち、初期創面の面積に対する面積比を次の式によって求め、その経時変化を調べた。その結果を表3に示す。

面積比(%) = { (観察日の創面の長径×短径) / (初期創面の長径×短径) } × 100

#### 【0061】

【表3】

実験No	実験群	面積比 [%]				
		0日	1日	3日	7日	10日
6	無処置	100	94	82	73	61
7	実施例3で作製したゲルシート処置	100	82	75	43	38

【0062】表3より難水溶性となった修飾ヒアルロン酸ゲルシートが創傷治療効果を増強することがわかった。

#### 【0063】

【発明の効果】以上、本発明によれば、難水溶性の修飾ヒアルロン酸ゲルが得られる。ヒアルロン酸ゲルの溶解性は桂皮酸修飾で低下することより、ヒアルロン酸ゲル

の溶解性を制御する方法として有用である。特に本発明の難水溶性の修飾ヒアルロン酸ゲルにより、(1)癒着防止材として理想的な生体内貯留性及び極めて高い安全性が得られる、(2)創面での滞留時間を大幅に改善することで術後癒着を顕著に抑制できる、(3)更には薬剤を直接結合させた修飾ヒアルロン酸ゲルによる薬物送達システムの担体としての応用が可能となる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C076 AA09 AA95 EE37 FF31  
4C081 AA06 AA07 AA12 AA14 BB06  
CD081  
4C086 EA21 EA22 EA25 MA01 MA04  
MA28 MA67 NA14 ZC80  
4C090 AA02 AA04 AA09 BA67 BB76  
BB97 CA19 CA38 DA10 DA22  
DA23